

Midazolam의 절제한 기니픽 기관평활근 이완에 미치는 Flumazenil 및 Verapamil의 영향

연세대학교 의과대학 마취과학교실

고신옥 · 김기준 · 김원옥 · 조성민 · 김명옥

= Abstract =

The Effects of Flumazenil and Verapamil on the Relaxation of Midazolam in Isolated Guinea-pig Tracheal Smooth Muscle

Shin Ok Koh, M.D., Ki Jun Kim, M.D., Won Oak Kim, M.D.
Seong Min Cho, M.D. and Myoung Ok Kim, M.D.

Department of Anesthesiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Midazolam relaxes airway smooth muscle. The aim of this study is to evaluate the influence of flumazenil or verapamil on the relaxation effects of midazolam in tracheal smooth muscle of guinea pig.

Methods: After isolating guinea-pig tracheal preparations, the maximal tracheal tones were induced by 2×10^{-7} M carbachol. When tracheal tones stabilized, midazolam was added cumulatively(10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} M, n=14) with or without flumazenil(10^{-6} M, n=15) and verapamil(10^{-5} M, n=13) to obtain the concentration-relaxation curves, and then the ED₅₀ and ED₉₅ calculated.

Results: Midazolam decreased maximal tracheal smooth muscle tones in concentration-dependent manners. Pretreatment with flumazenil had no effect on the midazolam-induced relaxation. Verapamil enhanced the relaxation effect of midazolam.

Conclusions: Midazolam relaxes airway smooth muscle and has synergistic effect with calcium channel blocker, verapamil. (Korean J Anesthesiol 1998; 34: 1~4)

Key Words: Airway: tracheal tone. Anesthetics, intravenous: midazolam. Animals: guinea-pig. Muscle: smooth muscle

서 론

벤조다이아제핀계 약물은 마취 및 중환자실 영역에서 많이 사용되고 있다. 특히 midazolam은 상대적으로 빠른 유도 속도와 높은 대사 청소율로 인하여 많이 선호되고 있다¹⁾. Midazolam은 혈관을 이완시키며²⁾, 동물실험에서 기도평활근을 이완시키는 것으로

밝혀졌으며^{3,4)}, 그 기전을 기도평활근 세포내 칼슘 농도 감소로 설명하고 있다⁴⁾.

본 연구에서는 midazolam의 기도평활근 이완효과를 확인하여 보고, 벤조다이아제핀계 약물의 중추성 길항제인 flumazenil과 칼슘통로차단제인 verapamil을 각각 병용 투여한 후, 이들이 기도평활근 이완에 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

암수 구분 없이 체중 350~450 g의 기니픽 20마리

리를 에테르로 마취시킨 다음 개흉부술과 경부 해부를 시행하였다. 기관을 윤상갑상막에서 기관분기부까지 분리 절제한 후, 100% O₂로 통기하며 상온에서 주위 지방조직과 교원조직을 제거하였다. 기관을 나선형으로 절개하여 열어 펼친 다음, 3개 내지 4개의 연골을 포함하게 몇개의 분절(7 mm×5 mm)로 나누었다.

기관 표본의 상단은 실로 묶어 작은 편에 고정하고 여기에 strain gauge transducer(Grass FT03, USA)를 연결시켰다. 기관 분절의 하단은 실로 연결하여 Krebs solution 25 ml가 들어 있는 organ bath에 수직으로 바닥에 고정시켰다. Organ bath는 37°C로 유지하고 95% O₂와 5% CO₂가 포함되어 되도록 하였다. Krebs 용액의 조성은 다음과 같았다 (mM/liter: NaCl 120.7, KCl 5.9, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 15.5, NaH₂PO₄ 1.2, glucose 11.5). 각 표본의 등척성 장력은 Grass model 7 polygraph(Grass medical instrument, USA)에 기록하였다. 각 표본은 1.5 g의 휴지기 장력을 걸고 90분간 평형을 이루도록 두었다. 각각의 표본에 2×10⁻⁷ M carbamylcholine chloride(carbachol®, Aldrich Chemical Co., USA)을 투여하여 등척성 장력이 최대가 되게 하였다. Midazolam 투여군(n=14)은 10⁻⁶, 3×10⁻⁶, 10⁻⁵, 3×10⁻⁵, 10⁻⁴ M 까지의 midazolam (Dormicum®, 한국로슈, 한국)을 20분 간격으로 누적 투여한 후 각 농도에서의 등척성 장력을 기록하였다. Flumazenil 전투여군(n=15)은 flumazenil (Anexate®, F.Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland) 10⁻⁶ M³⁾을 투여한 다음, 30분후 2×10⁻⁷ M carbamylcholine chloride 투여하여 등척성 장력이 최대가 되게 한 후, midazolam을 누적 투여하였다. Verapamil 전투여군(n=13)은 verapamil(이금틴®, 일성신약, 한국) 10⁻⁵ M⁵⁾을 투여한 다음, 15분후 2×10⁻⁷ M carbamylcholine chloride 투여하여 등척성 장력이 최대가 되게 한 후 midazolam을 누적 투여하였다. 다음 단계의 실험을 하기 전에 모든 표본들은 15분 간격으로 Krebs solution 세척을 각각 3회 시행하였다. Carbachol로 유도된 최대 기관평활근장력에 대하여 midazolam에 의해 이완된 기관평활근장력의 비인 이완율(relaxation percent)을 구하였으며, 그 값들은 평균±표준오차(mean±SE)로 표현하였다. 유도된 최대 기관평활근장력을 50%, 95% 감소시키는 농도인 ED₅₀, ED₉₅는 four-parameter logistic equation으로 구하였다⁶⁾. 각 실

험군에서 midazolam 농도를 증가시킴에 따른 이완정도의 변화는 repeated measured ANOVA로, 같은 midazolam 농도에서 각 실험군 사이의 이완정도 비교와 각 실험군의 ED₅₀, ED₉₅의 비교는 unpaired t-test로 검정하였으며, p 값은 0.05 미만을 의의있 것으로 보았다.

결 과

1) Carbachol로 전수축시킨 기니豬 기관평활근장력에 대한 midazolam군 및 flumazenil 전처치군, verapamil 전처치군의 이완효과

Midazolam을 10⁻⁶, 3×10⁻⁶, 10⁻⁵, 3×10⁻⁵, 10⁻⁴ M로 누적투여함에 따라 농도의존적(concentration-dependent)으로 이완되었다(p<0.05). Flumazenil 전처치군과 verapamil전처치군에서도 midazolam의 농도에 비례하여 이완되었다(p<0.05). Verapamil 전처치군은 10⁻⁶, 3×10⁻⁶ M에서 midazolam군보다 이완율이 의의있게 높았다(p<0.05)(Table 1).

2) Carbachol에 의해 유도된 기니豬 기관평활근장력에 대한 midazolam군 및 flumazenil 전처치군, verapamil 전처치군의 ED₅₀, ED₉₅

Midazolam군의 ED₅₀는 33.6±5.7 μM, ED₉₅는 585.9

Table 1. The Effects of Midazolam and Additives on the Relaxation of Guinea-pig Tracheal Tone Induced by 2×10⁻⁷ M Carbachol

Concentration (M)	Relaxation(%)		
	Midazolam (n=14)	Flumazenil pretreatment (n=15)	Verapamil pretreatment (n=13)
10 ⁻⁶	4.0±1.4	2.4±1.1	12.1±1.6*
3×10 ⁻⁶	9.2±1.3	8.1±2.3	22.8±2.4*
10 ⁻⁵	24.4±3.7	20.1±2.9	34.0±3.2
3×10 ⁻⁵	51.1±3.8	46.1±4.1	60.5±5.1
10 ⁻⁴	90.8±3.2	82.7±3.4	93.4±2.3

Values are expressed as mean ± SE.

*: P<0.05 Midazolam group versus Verapamil pretreatment group.

Table 2. The Values of ED₅₀ and ED₉₅ for Guinea-pig Tracheal Tone Relaxation of Midazolam and Additives

	ED ₅₀ (μM)	ED ₉₅ (μM)	n
Midazolam	33.6±5.7	585.9±160.8	14
Flumazenil pretreatment	46.8±8.4	972.7±305.7	15
Verapamil pretreatment	19.8±3.0*	343.4±88.3	13

Values are expressed as mean±SE.

*: P<0.05 Midazolam versus Verapamil pretreatment.

±160.8 μM이었다. Flumazenil 전처치군의 ED₅₀는 46.8±8.4 μM, ED₉₅는 972.7±305.7 μM이었다. Verapamil 전처치군의 ED₅₀는 19.8±3.0 μM, ED₉₅는 343.4 ±88.3 μM이었다. Midazolam군과 flumazenil 전처치군 사이의 ED₅₀과 ED₉₅는 의의있는 차이가 없었다. Midazolam군과 verapamil 전처치군 사이의 ED₅₀는 의의있는 차이가 있었으나(p<0.05), ED₉₅는 의의있는 차이가 없었다(p>0.05)(Table 2).

고 찰

기도이완의 기전으로는 반사궁의 차단⁷⁾, 화학 매개체 유리의 억제⁸⁾, 기관평활근의 직접적인 이완⁹⁾ 등이 있고, 직접적인 이완의 대표적인 기전으로는 칼슘통로봉쇄가 알려져 있다⁹⁾. 또한 최근에는 포타슘통로개방도 하나의 기전으로 밝혀졌다¹⁰⁾.

기관평활근을 이완시키는 대표적인 약물들의 작용양상에 대한 여러가지 연구가 있다. 칼슘통로봉쇄제는 K⁺로 유도된 기관평활근의 수축을 carbachol, histamine으로 유도된 기관평활근수축보다 더욱 강하게 억제시킨다^[11,12]. 포타슘통로개방제는 세포로부터 K⁺을 유출시켜 세포를 과분극시킴으로써 기관평활근 이완효과를 얻는데, 20~30 mM K⁺으로 유도된 경우에는 80 mM 이상의 K⁺, histamine, tetraethyl ammonium(TEA)로 유도된 경우보다 상대적으로 이완효과가 더 크다고 한다^[10,13]. Verapamil은 carbachol에 의한 기도평활근장력을 감소시켜 lidocaine에 의한 이완효과를 증가시킨다⁵⁾. Theophylline과 β₂ 수용체봉쇄제는 KCl로 유도된 수축보다 carbachol로 유도된

수축을 더욱 더 억제시킨다^[12]. Propofol 및 ketamine은 carbachol, histamine, 30 mM K⁺ 혹은 124 mM K⁺ 등에 의해 수축된 기니피의 기관평활근을 농도의 존적으로 이완시키며, 그 기전은 단순히 기관평활근 수축을 막개하는 특정한 수용체를 봉쇄함으로써 생기는 것이 아니라, 수용체 이하 단계 또는 이온통로에 작용하거나, 비선택적으로 모든 수용체에 작용한다고 한다^[14].

본 연구에서 midazolam은 carbachol로 수축유도된 기니피 기관평활근을 농도비례적으로 이완시켰다. 이는 Yoshimura등⁴⁾의 연구결과와도 일치하며, midazolam이 세포외 칼슘의 유입을 억제하여 세포내 칼슘농도를 낮춤으로써 이완효과를 발휘하며, 세포소기관내 저장칼슘의 유리와는 관계가 없다고 한다⁴⁾.

벤조다이제핀 수용체 길항제에는 PK11195같은 말초성 길항제와 flumazenil같은 중추성 길항제의 2가지가 있다. PK11195같은 말초성 길항제는 midazolam의 기관평활근 이완효과에 특별한 영향을 미치지 않는다^[15]. 본 연구에서는 flumazenil 전처치후 midazolam을 투여하여 midazolam 단독투여후의 이완효과와 비교해 보았다. Flumazenil 전처치군에서도 midazolam의 농도에 비례하여 이완효과가 나타났으며, 전반적으로 midazolam군보다 이완효과가 적었으나 통계적인 의의는 없었다. 이는 벤조다이제핀계 중추성 길항제도 midazolam의 기관평활근 이완효과에 특별한 영향을 끼치지 않으며, 따라서 midazolam의 기관평활근 이완효과는 중추진정효과와 그 기전이 다르다는 것을 알 수 있다. Koga등³⁾은 10⁻⁶, 10⁻⁷ M의 flumazenil을 사용하여 본 실험과 같은 결과를 얻었다.

칼슘통로봉쇄제인 verapamil을 전처치한 후 midazolam을 투여한 경우 기관평활근 이완효과는 midazolam 농도가 증가함에 따라 의존적으로 증가하였다. 또한 verapamil 전처치군의 이완효과는 midazolam 단독투여군보다 전반적으로 높았으며, 특히 10⁻⁶, 3×10⁻⁶ M에서 midazolam 단독투여군보다 이완율이 의의있게 높았다(p<0.05). Verapamil은 L-type voltage-operated 칼슘통로 봉쇄제로 기관평활근을 이완시키며^{5,9)}, 또한 lidocaine의 기관평활근 이완효과에 상승작용이 있다⁵⁾. 따라서 verapamil은 칼슘통로를 봉쇄하여 세포내 칼슘 농도를 감소시킴으로써, 같은 기전으로 기관평활근을 이완시키는 midazolam의 관평활근 이완효과에 상승작용이 있음을 알 수 있다.

본 연구에서는 무스카린 수용체 효현제(muscarinic receptor agonist)인 carbachol로 기관평활근의 최대수축장력을 유도하였는데, G-protein을 통하여 세포내 diacylglycerol을 증가시킴으로써 수축이 이루어진다¹⁶⁾. 따라서 여러가지 다른 기전으로 이루어지는 자발적 수축 혹은 고농도 및 저농도 KCl, histamine, TEA 등으로 유도한 경우에도 본 실험과 같은 결과가 나올지는 알 수 없다.

기관상피는 장벽기능, 수축 및 이완인자의 분비, 패밀리드 분해 등을 통해서 기도직경의 크기조절에 관여함이 알려져 있으나¹⁷⁾, 본 연구에서는 기관상피를 제거하지 않은 상태에서 기관평활근의 수축 및 이완 정도를 측정하였으므로 추후 midazolam 및 verapamil이 기관상피를 매개하여 기관평활근 이완에 미치는 작용에 대하여 관찰해 볼 필요성이 있다고 여겨진다.

결론적으로 midazolam은 기니피 기관평활근을 농도비례적으로 이완시키며, 벤조다이제핀 중추성 수용체 길항제인 flumazenil은 midazolam의 이완작용에 별 영향이 없으며, L-type voltage-operated 칼슘통로 봉쇄제인 verapamil은 midazolam의 이완작용에 상승효과가 있다.

참 고 문 헌

- Reves JG, Fragen RJ, Vinik HR, Greenblatt DJ: Midazolam: Pharmacology and Uses. Anesthesiology 1985; 62: 310-24.
- Chang KSK, Feng MG, Davis RF: Midazolam produces vasodilation by mixed endothelium-dependent and independent mechanisms. Anesth Analg 1994; 78: 710-7.
- Koga Y, Sato S, Sodeyama N, Takahashi M, Kato M, Iwatsuki N, et al: Comparison of the relaxant effects of diazepam, flunitrazepam and midazolam on airway smooth muscle. Br J Anaesth 1992; 69: 65-9.
- Yoshimura H, Kai T, Nishimura J, Kobayashi S, Takahashi S, Kanaide H: Effects of midazolam on intracellular Ca^{2+} and tension in airway smooth muscles. Anesthesiology 1995; 83: 1009-20.
- 고신옥, 김원옥, 길혜금, 김종래: 기니피 기관평활근 장력에 대한 lidocaine 효과. 대한마취과학회지 1996; 30: 414-8.
- De Lean A, Munson PJ, Rodbard D: Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves; Application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. Am J Physiol 1978; 235: E97-E102.
- Downes H, Gerber N, Hirshman CA: IV lignocaine in reflex and allergic bronchoconstriction. Br J Anaesth 1980; 52: 873-8.
- Weiss EB, Hargraves WA, Viswanath SG: The inhibitory action of lidocaine in anaphylaxis. Am Rev Respir Dis 1978; 117: 859-69.
- Weiss EB, Anderson WH, O'Brien KP: The effect of local anesthetic, lidocaine on guinea pig trachealis muscle in vitro. Am Rev Respir Dis 1975; 112: 393-400.
- Nielsen-Kudsk JE, Bang L: Effects of pinacidil and other cyanoguanidine derivatives on guinea-pig isolated trachea, aorta and pulmonary artery. Eur J Pharmacol 1991; 201: 97-102.
- Advenier C, Cerrina J, Duroux P, Floch A, Renier A: Effects of five different organic calcium antagonists on guinea-pig isolated trachea. Br J Pharmacol 1984; 82: 727-33.
- Nielsen-Kudsk JE, Karlsson JA, Persson CG: Relaxant effects of xanthines, a β_2 -receptor agonist and Ca^{2+} antagonists in guinea-pig tracheal preparations contracted by potassium or carbachol. Eur J Pharmacol 1986; 128: 33-40.
- Allen SL, Boyle JP, Coetijo J, Foster RW, Morgan GP, Small RC: Electrical and mechanical effects of BRL3491 in guinea-pig isolated trachealis. Br J Pharmacol 1986; 89: 395-405.
- 김기준, 고신옥, 김원옥, 남용택: 기니피 기관평활근에 대한 propofol과 ketamine의 이완효과. 대한마취과학회지 1997; 32: 185-91.
- Raeburn D, Miller LG, Summer WR: Peripheral type benzodiazepine receptor and airway smooth muscle relaxation. J Pharmacol Exp Ther 1988; 245: 557-62.
- Takuwa Y, Takuwa N, Rasmussen H: Carbachol induces a rapid and sustained hydrolysis of polyphosphoinositide in bovine tracheal smooth muscle measurements of the mass of polyphosphoinositides, 1,2-diacylglycerol, and phosphatidic acid. J Biol Chem 1986; 261: 14670-5.
- Hirshman CA, Bergman NA: Factors influencing intrapulmonary airway calibre during anaesthesia. Br J Anaesth 1990; 65: 30-42.